

细菌内毒素检查法应用指导原则

本指导原则是对细菌内毒素检查法的内容及应用做进一步的说明。

1. 细菌内毒素限值的设定

产品的细菌内毒素限值一般是通过公式 $L=K/M$ 计算得到的。其中 M 为人用每千克体重每小时最大供试品剂量，可参考药品说明书或具有权威性资料的用法用量。

制定品种细菌内毒素限值时，应考虑以下情况：

(1)，若联合用药应考虑其他制剂可能引入的细菌内毒素；若儿科用药、营养不良用药和恶病质用药等，应考虑细菌内毒素对体弱患者人群可能导致更严重的影响。因此，制定上述品种细菌内毒素限值时，可在计算值的基础上适当严格。

(2) 100ml 及以上装量的大输液类制剂，其细菌内毒素限值一般不得超过 0.50EU/ml。

(3) 制定具有多种规格注射液的细菌内毒素限值时，限值的单位应与产品临床用法用量 (M) 的标示单位一致，如 EU/mg、~~或 EU/U~~ 或 EU/mL。

(4) 制定原料药的细菌内毒素限值时，应参考其制剂的细菌内毒素限值。

2. 细菌内毒素检查方法的选择

细菌内毒素检查法（通则 1143）~~包括凝胶法和光度法~~ ~~收载于~~ 共 6 种细菌内毒素检查方法。供试品检测时可以选用其中任何一种方法进行细菌内毒素检查。

(1) 凝胶法

凝胶法的优点是操作简便，供试品在排除干扰作用后均可使用凝胶法进行检验。

凝胶法的干扰试验是确定供试品能否使用凝胶法的决定因素。进行干扰实验时，应挑选与鲎试剂反应呈阴性的样品进行干扰试验。

若样品稀释到 MVD 仍不能排除干扰作用，应进一步对供试品的前处理进行研究，再用干扰试验验证能否使用凝胶法。

(2) 光度法

光度法（包括浊度法和显色法）可定量检测内毒素的含量，能较为准确评估产品在生产过程中污染的相对风险，定量检测的数据不仅有利于追踪产品质量趋

势，还能起到风险预警的作用，更易达到数据完整性的要求。

供试品能否采用光度法进行检测，须通过干扰试验确定。光度测定法可通过回收率判断出干扰的趋势，尤其对于研究性质的样品（如新产品）更具有优势。

由于光度法动态法的检测限范围比凝胶法宽，使得有干扰的样品可以有更大的稀释倍数，对于部分使用凝胶法无法排除干扰的样品，可以尝试使用光度法动态法建立细菌内毒素检测方法。

3. 供试品的前处理方法

除另有规定外，一般应使用内毒素检查用水溶解样品进行细菌内毒素检查。

在水中溶解度低的样品可以采取超声波、加热助溶、添加助溶剂、调节 pH 等方法提高其溶解度。当采用适宜的有机溶剂（乙醇、DMSO 等）进行溶解时，必须进行干扰试验验证内毒素的回收。

采用包合技术的新型制剂如微球、脂质体等供试品，应采取适宜方法将包合体破坏，使包裹在内部的细菌内毒素完全释放，再进行检测。

4. 产品细菌内毒素检查法的建立

建立品种的细菌内毒素检查法时，为验证样品和不同生产厂家鲎试剂反应的一致性，应使用两个生产厂家的鲎试剂对至少三批样品进行干扰试验。

建立产品细菌内毒素检查法时，若无法排除供试品对细菌内毒素检查的干扰作用，或只能使用最高灵敏度鲎试剂（凝胶法为 0.03EU/ml，光度法为 0.001EU/ml）才能排除干扰，则该品种不宜建立细菌内毒素检查项。

5. 其他

实验时，当使用规格大于 0.1ml/支装量的鲎试剂时，为避免鲎试剂支间活性差异带来的影响，应将鲎试剂复溶后混合，再分装到反应容器中使用。凝胶法常用的反应容器为 10mm×75mm 的玻璃小试管或空安瓿等，光度法常用的反应容器为测定仪专用试管或酶标板。

在凝胶法中，在检验时，如果计算出的 MVD 值不是整数，可以使用小于 MVD 的整数进行实验。当出现阳性结果时，为判断产品是否合格，需采用计算的 MVD 重新测试。

目前，新的细菌内毒素检测方法不断出现，以适应特殊品种细菌内毒素检查的需要，或减少鲎试剂的使用量。如重组 C 因子法（见本通则附：重组 C 因子法）、微量凝胶法等。当采用细菌内毒素检查法（通则 1143）中未收载的方法检测产

品的细菌内毒素时，应符合“凡例”的相关规定。

附

重组 C 因子法

C 因子是鲎试剂中对细菌内毒素敏感的蛋白，能够选择性识别内毒素。重组 C 因子是一种人工合成的 C 因子，它被细菌内毒素活化后，可与荧光底物作用产生与内毒素浓度成比例的荧光信号。

本法系依据反应混合物中的内毒素浓度和其孵育终止时的荧光值之间存在量化关系来测定细菌内毒素的含量。本法为终点荧光法。依据检测原理，本法不存在 G 因子旁路干扰，具有较高的专属性，因此适合于含有 β 葡聚糖干扰的样品检测；本法所用试剂不含有 B 因子和凝固酶原、凝固蛋白原等，因此含有对上述物质抑制或增强作用的样品适合使用重组 C 因子法。

重组 C 因子法试验需采用荧光酶标仪，其激发和发射波长等参数参照试剂的使用说明书，激发/发射波长一般为：380nm/440nm，检测温度一般为 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

仪器灵敏度（增益值）调节、重组 C 因子试剂的配制方法、保温时间等，参照所用仪器和试剂的有关说明进行。

标准曲线的可靠性试验、干扰试验、检查法以及结果判断 参照细菌内毒素检查法（通则 1143）中的方法 2 光度测定法。